

2013 年 4 月
April 2013

色 谱
Chinese Journal of Chromatography

Vol. 31 No. 4
380 ~ 385

研究论文

DOI: 10.3724/SP.J.1123.2012.10037

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定纺织品和皮革中偶氮染料释放的致癌芳香胺

温裕云^{1,2}, 欧 延², 何明超², 弓振斌^{3*}

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 福建 厦门 361005; 2. 福建远东技术服务有限公司, 福建 泉州 362006;
3. 厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)快速测定纺织品和皮革中偶氮染料释放的致癌芳香胺物质的方法。样品前处理采用 BS EN 14362-1:2012(纺织品)和 ISO 17234-1:2010(皮革)方法,然后采用甲醇定容,再用 Eclipse XDB-C18 RRHD 色谱柱进行梯度洗脱分离,流动相为甲醇和水;采用电喷雾正离子模式,并用多反应监测模式(MRM)测定,外标法定量。方法优化了色谱分离条件、质谱碎裂电压、碰撞能量等,并考察了不同样品基质对回收率的影响。方法的定量限小于 0.2 mg/kg;不同基质不同浓度的加标回收率在 70%~120%之间(添加水平为 500、1 000、1 500 $\mu\text{g/L}$, $n=7$);相对标准偏差小于 15%。该方法的灵敏度远小于欧盟与我国国家标准要求的 30 mg/kg,完全满足其定性定量的检测要求,并且检测速度快,选择性好。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 致癌芳香胺; 偶氮染料; 纺织品; 皮革

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2013)04-0380-06

Determination of carcinogenic aromatic amines derived from azo colorants in textiles and leather by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WEN Yuyun^{1,2}, OU Yan², HE Mingchao², GONG Zhenbin^{3*}

(1. College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Fareast Testing & Technology Services Co. Ltd, Quanzhou 362006, China;
3. College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: A rapid determination method was developed for the quantification and confirmation of 22 carcinogenic aromatic amines derived from azo colorants in textiles and leather by ultra high performance liquid chromatography-tandem electrospray ionization mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The methods of EN 14362-1:2012 (for textiles) and ISO 17234-1:2010 (for leather) were adopted for sample pretreatment, finally diluted with methanol. The target compounds were separated by an Eclipse XDB-C18 RRHD column and eluted with methanol and water in gradient, and then determined by positive electrospray ionization mass spectrometry under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The external standard method was used for the quantitative analysis. The separation conditions, fragment voltages, collision energies, etc. were optimized. The limits of quantification (LOQ) were below 0.2 mg/kg for different compounds, matrix spike recoveries ranged from 70% to 120% at the spiked levels of 500, 1 000 and 1 500 $\mu\text{g/L}$, and the relative standard deviations (RSDs) were less than 15%. The proposed method is rapid, sensitive, accurate and selective.

Key words: ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); carcinogenic aromatic amines; azo colorants; textiles; leather

芳香胺(aromatic amines, AAs)化合物作为合成 中间体在偶氮染料、杀虫剂、橡胶、粘合剂、塑料和制

* 通讯联系人. Tel/Fax: (0592) 2186572, E-mail: zbgong@xmu.edu.cn.

基金项目: 福建省自然科学基金重点项目(B0220001); 远东技术服务有限公司委托项目.

收稿日期: 2012-11-07

药工业中被广泛使用,其中合成染料工业占了50%的生产量^[1]。部分偶氮染料在一定的条件下,能分解出各种芳香胺类物质,而大量的研究表明某些芳香胺具有致癌或潜在致癌作用^[2],因此自20世纪90年代以来,欧盟、美国、日本等国家和组织制定了相应的法规禁止在其市场出售会产生致癌芳香胺的纺织品和皮革制品,并制定了相应的检测标准方法^[3-5]。我国也制定了用于纺织品和皮革中禁用偶氮染料测定的国家标准方法^[6]。

目前,致癌芳香胺的测定方法主要有气相色谱法(GC)^[7]、气相色谱-单级质谱法(GC-MS)^[8-9]、液相色谱法(HPLC)^[10-12]、液相色谱-单级质谱法(HPLC-MS)^[13]。但这些方法均存在一定的局限性,GC和HPLC通常灵敏度和定性能力较差,因此可能出现假阳性结果;GC-MS和HPLC-MS灵敏度较高,但如果采用EN 14362-1:2012的快速筛选方法时,前处理的简化使MS检测时的基线较高,也可能出现假阳性结果而须用另一色谱方法进行确证。超高效液相色谱-串联质谱法(UHPLC-MS/MS)中母离子与子离子一一对应的多重反应监测模式(MRM)可以有效去除因复杂基质干扰而引起的假阳性现象,在分析速度、灵敏度、选择性方面具有很好的优势,近年来得到快速普及。但采用UHPLC-MS/MS测定纺织品和皮革中偶氮染料释放的AAs的方法鲜有报道,Sutthivaiyakit等^[14]用大气压化学源(APCI)串联质谱法测定了纺织品中的18种AAs;张焱等^[15]、韩京等^[16]、吴转璋等^[17]采用电喷雾电离源质谱测定了一些AAs;唐川江等^[18]用HPLC-MS/MS方法测定了纺织品中的致癌芳香胺,但文章采用的是常压HPLC,没有考察质谱测定过程中的基质效应。本实验通过优化色谱、质谱检测条件,建立了同时测定纺织品或皮革中偶氮染料释放的22种致癌芳香胺的UHPLC-MS/MS方法。本方法快速、准确、灵敏、选择性好。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

Agilent 1290 液相色谱仪; Agilent 6460 三重串联四极杆质谱仪,系统配置: Agilent JetStream Technologies (AJS) 电喷雾离子源(ESI)接口, MassHunter 工作站软件。

甲醇、乙腈为LC/MS级(Merck公司);甲酸铵、甲酸为LC/MS级(Sigma公司);甲基叔丁基醚(HPLC级,Tedia公司);Milli-Q超纯水;固相萃取装置;硅藻土萃取柱(20 g/20 mL,迪马科技);旋转

蒸发仪(日本东京理化)。

22种芳香胺标准物质购自Dr. Ehrenstorfer公司,纯度均大于95%,各组分的名称见表1。

1.2 仪器条件

色谱条件 色谱柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 RRHD(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。流动相为甲醇(MeOH)和水,梯度洗脱: 0~2.0 min, 10% MeOH~30% MeOH; 2.0~3.3 min, 30% MeOH; 3.3~7.2 min, 30% MeOH~65% MeOH; 7.2~8.0 min, 65% MeOH~100% MeOH。进样量: 2.0 μL。后运行时间: 2 min。流速: 0.5 mL/min。柱温 40℃。

质谱条件 电喷雾正离子模式(ESI⁺);干燥气温度: 350℃;干燥气流速: 8 L/min;雾化器压力: 241.3 kPa (35 psi);鞘气温度: 380℃;鞘气流速: 10 L/min;毛细管电压: 4 000 V;喷嘴电压: 500 V。定性和定量采用MRM模式,具体参数见表1;采用外标法定量。

1.3 标准样品溶液的制备

准确称取各芳香胺标准品,用甲醇配制成质量浓度为1.0 g/L的标准储备液。使用时,用甲醇稀释至所需浓度。

1.4 样品前处理

纺织品采用BS EN 14362-1:2012方法、皮革样品采用ISO 17234-1:2010方法进行前处理,最后采用甲醇定容至2.0 mL,过0.22 μm滤膜后,待测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

实验考察了甲醇/水和乙腈/水两种流动相对目标AAs的离子化效率的影响。结果表明,以甲醇/水作为流动相时,大多数AAs的[M+H]⁺离子的丰度响应明显优于乙腈/水,因此采用甲醇/水为流动相,并且采用梯度洗脱技术提高分离能力、改善峰形、缩短分析时间,尽可能减少各组分在共流出时导致的离子化过程中的相互抑制。优化后的梯度洗脱程序见1.2节中的色谱条件。22种AAs在最佳色谱条件下的保留时间数据见表1,分离情况见图1,可见大多数组分得到较好分离并且在9 min内能完成AAs的快速分离检测。

2.2 质谱条件的优化

进样1.0 mg/L的标准溶液,经过单级质谱全扫描方式发现各AAs在甲醇/水、乙腈/水或其含有甲酸铵、甲酸的流动相中主要形成[M+H]⁺母离子。为了获得最佳的定性定量MRM参数,本实验采用仪器自带的优化软件Optimizer对碎裂电压(fragmentation voltage)进行优化。

mentor)、碰撞能量(collision energy, CE)、MRM 离子对进行优化,得到的最佳 MRM 采集参数见表 1。

表 1 目标组分的 MRM 分析参数
Table 1 MRM conditions for target compounds

No.	Compound	CAS No.	t_R /min	Precursor ion (m/z)	Fragmentor/V	Product ion (m/z)	CE/V
1	4-aminobiphenyl	92-67-1	7.25	170	130	152.1 [*] 77.1	33 48
2	benzidine	92-87-5	3.20	185	110	167.1 [*] 115.1	29 45
3	4-chloro- <i>o</i> -toluidine	95-69-2	6.25	142	110	106.1 [*] 89.1	29 33
4	2-naphthylamine	91-59-8	5.95	144	110	127.1 [*] 77.1	21 37
5	<i>o</i> -aminoazotoluene	97-56-3	8.44	226	110	91.1 [*] 65.1	21 45
6	2-amino-4-nitrotoluene	99-55-8	4.91	153	90	107.1 [*] 89.1	13 41
7	4-chloroaniline	106-47-8	4.66	128	90	93.1 [*] 75.1	17 37
8	2,4-diaminoanisole	615-05-4	1.45	139	90	124.1 [*] 108.1	13 13
9	4,4'-methylenedianiline	101-77-9	5.18	199	150	106.1 [*] 77.1	21 50
10	3,3'-dichlorobenzidine	91-94-1	7.66	253	130	217.1 [*] 182.1	17 29
11	3,3'-dimethoxybenzidine	119-90-4	5.64	245	110	187.1 [*] 230.2	33 13
12	3,3'-dimethylbenzidine	119-93-7	5.68	213	130	180.1 [*] 198.2	33 17
13	4,4'-methylenedi- <i>o</i> -toluidine	838-88-0	6.88	227	150	120.1 [*] 77.1	25 50
14	6-methoxy- <i>m</i> -toluidine	120-71-8	5.35	138	90	123.1 [*] 77.1	13 37
15	4,4'-methylene-bis-(2-chloro-aniline)	101-14-4	8.02	267	130	231.1 [*] 140.1	29 25
16	4,4'-oxydianiline	101-80-4	3.47	201	130	108.1 [*] 80.1	17 33
17	4,4'-thiodianiline	139-65-1	5.79	217	130	124.1 [*] 80.1	17 45
18	<i>o</i> -toluidine	95-53-4	3.62	108	90	91.1 [*] 65.1	17 25
19	2,4-diaminotoluene	95-80-7	1.64	123	90	77.1 [*] 108.1	29 13
20	2,4,5-trimethylaniline	137-17-7	6.70	136	110	91.1 [*] 121.1	21 13
21	<i>o</i> -anisidine	90-04-0	3.35	124	90	109.1 [*] 80.1	13 33
22	4-aminoazobenzene	60-09-3	7.80	198	110	77.1 [*] 51.1	17 49

* Quantitative ion. CE: collision energy.

本实验还考察了流动相中甲酸铵浓度(0, 0.5, 2.5 mmol/L)或甲酸浓度(体积比为 0%, 0.01%, 0.05%, 0.1%)对 AAs 检测灵敏度的影响,结果表明,采用添加了甲酸铵的流动相时,大多数组分的质谱信号响应降低,并且浓度越高,质谱信号越低,表明甲酸铵对大多数 AAs 组分在离子化过程中会产

生抑制作用;流动相中加入一定浓度的甲酸也有类似的结果。尽管甲酸铵或乙酸缓冲液在 LC-MS 中常用于调节流动相 pH 值或用于离子化试剂,但对芳香胺分析物来说,低浓度的甲酸铵或乙酸对 $[M+H]^+$ 母离子的离子化效率抑制作用仍是比较强的。因此,优化后的实验中没有添加任何离子化试剂。

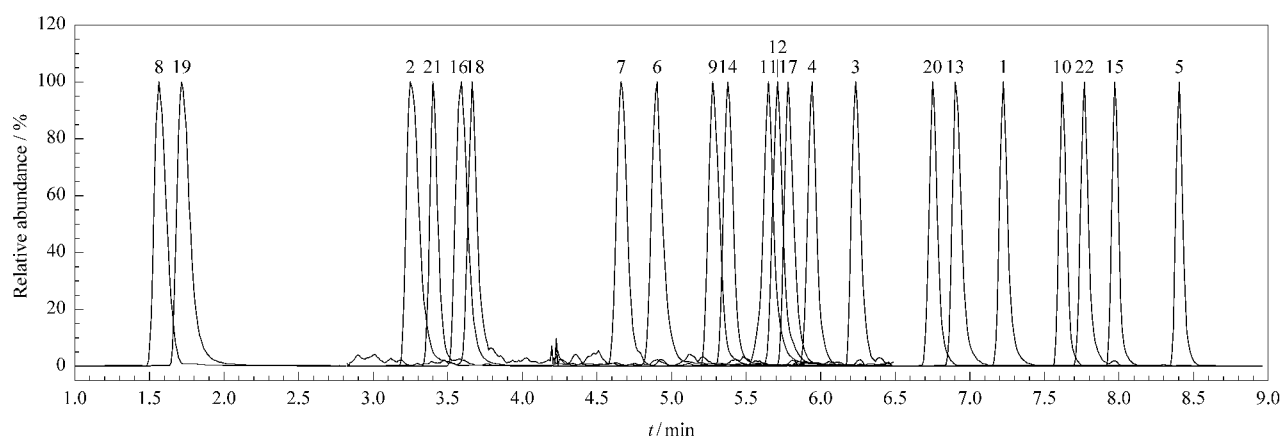


图1 22种芳香胺的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of the 22 aromatic amines (AAs) (1.0 mg/L)

The Nos. are corresponding to Table 1.

2.3 方法的线性关系、线性范围和定量限

用初始流动相配比(10% 甲醇水溶液)分别配制2、5、10、50、100、200、500、1 000、2 000、5 000 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液,在优化后的色谱、质谱条件下进行测定,以标准工作溶液中目标AAs的质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,目标AAs的定量离子对峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,结果如表2。实验结果表明22种芳香胺在各自的浓度范围内有良好

表2 22种化合物的线性关系和仪器定量限

Table 2 Linear relationships and instrument limits of quantification (LOQ) of the 22 compounds

No. *	Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	Regression equation	r^2	LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)
1	10 - 2000	$Y = 214.8X + 16431.6$	0.995 1	5
2	5 - 500	$Y = 238.4X + 11543.8$	0.994 3	1.5
3	100 - 2000	$Y = 2.2X + 18.8$	0.998 3	90
4	10 - 1000	$Y = 349.8X + 26002.4$	0.994 2	5
5	10 - 2000	$Y = 66.0X - 261.9$	0.999 1	1.5
6	50 - 2000	$Y = 8.8X + 152.8$	0.998 4	30
7	50 - 5000	$Y = 9.7X + 0.4$	0.999 6	50
8	50 - 2000	$Y = 38.1X - 389.0$	0.993 8	30
9	5 - 500	$Y = 758.9X + 12915.3$	0.993 7	1.5
10	10 - 2000	$Y = 47.6X + 1221.3$	0.997 5	10
11	10 - 1000	$Y = 374.7X + 7100.7$	0.995 6	5
12	10 - 500	$Y = 498.0X + 9770.7$	0.992 9	5
13	5 - 500	$Y = 835.0X + 24877.9$	0.994 6	1.5
14	5 - 1000	$Y = 353.6X + 5916.5$	0.996 8	1.5
15	10 - 2000	$Y = 36.0X + 792.8$	0.997 9	1.5
16	5 - 500	$Y = 794.6X + 16064.2$	0.992 8	1.5
17	10 - 1000	$Y = 397.0X + 6709.2$	0.992 7	5
18	50 - 2000	$Y = 2.78X + 40.1$	0.999 5	50
19	5 - 1000	$Y = 167.7X + 4482.4$	0.995 8	5
20	10 - 2000	$Y = 92.0X + 2878.9$	0.995 9	5
21	10 - 1000	$Y = 183.2X + 3440.0$	0.998 1	10
22	2 - 500	$Y = 532.4X + 19911.8$	0.992 9	1.5

* The Nos. are corresponding to Table 1. Y : peak area; X : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

的线性关系,相关系数均大于0.992。在信噪比(S/N)=10的条件下,得到各组分的仪器定量限,也列于表2中,AAs组分的定量限(LOQ)均小于100 $\mu\text{g/L}$,对应实际样品中的含量为0.2 mg/kg,远小于欧盟与我国国家标准要求的30 mg/kg,完全满足其定量检测的要求。

2.4 不同基质加标回收试验和精密度试验

BS EN 14362-4:2012方法中如果采用GC-MS法,用内标法进行定量,能减小因进样、基质差异带来的对测定结果的影响,提高定量的准确度和精密度。当采用LC-MS/MS时,尽管母离子和子离子一一对应的MRM模式可以在很大程度上去除基质杂质干扰,但复杂样品共提取基质成分和试样前处理过程引入的外来杂质可能会抑制或增强目标分析物在ESI源的离子化效率,进而影响到分析结果的准确度和精密度,这一现象即所谓的基质效应(matrix effect, ME)在方法验证中是必须考察的。由于分析的AAs组分众多,并且稳定同位素内标价格昂贵,在实际分析工作中对每种组分采用稳定同位素内标进行定量不太现实,因此本实验分别采用不同基质如合成纤维(涤纶)、天然纤维(棉)、天然皮革(牛皮)前处理后的溶液配制标准溶液,考察其基质效应。结果表明,在加标质量浓度较低(50、100 $\mu\text{g/L}$)时,回收率较低(大多数组分在5%~90%之间),基质对目标化合物的影响较显著;当加标质量浓度为500、1 000、1 500 $\mu\text{g/L}$ 时,除5[#](邻氨基偶氮甲苯)在合成纤维和天然皮革中,及19[#](2,4-二氨基甲苯)在合成纤维中的回收率较低外,其他大多数组分的回收率在70%~120%之间,表明在此质量浓度范围时基质对目标化合物的影响并不显著,具体结果见表3。因此如果分析的目标组分浓度较低

时,建议采用基质匹配的标准溶液进行定量。

取不同材料,分别进行 7 次平行实验,即在前处理过程的裂解反应液中加入不同浓度水平的标准溶

液,过硅藻土萃取柱,按 1.4 节方法浓缩定容后测定,计算方法的精密度,各组份含量的相对标准偏差小于 15%。

表 3 22 种化合物的基质加标回收率

Table 3 Matrix spike recoveries of the 22 compounds

No. *	Natural fiber (cotton) /%			Synthetic fiber (dacron) /%			Natural leather (cow leather) /%		
	500 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$	1500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$	1500 $\mu\text{g/L}$	500 $\mu\text{g/L}$	1000 $\mu\text{g/L}$	1500 $\mu\text{g/L}$
1	102.3	113.9	94.9	90.9	92.9	93.5	87.7	92.6	81.8
2	115.1	119.3	97.8	110.0	105.6	89.0	95.0	90.1	80.1
3	96.7	103.8	89.2	103.0	100.0	101.3	103.8	94.2	88.7
4	104.9	113.2	93.5	100.7	105.7	96.0	121.4	108.6	94.6
5	112.1	116.7	94.8	30.5	45.8	66.4	21.4	27.2	24.9
6	100.5	101.3	88.1	95.5	97.9	90.0	100.4	98.1	87.0
7	108.5	107.6	94.0	105.7	103.3	96.9	97.3	91.0	83.9
8	111.2	119.8	102.4	73.5	76.0	77.9	115.8	113.9	107.3
9	109.8	116.3	97.1	115.5	119.6	105.2	98.8	104.9	94.3
10	119.1	127.3	106.5	71.9	79.4	74.6	94.9	85.2	73.4
11	116.4	110.7	106.8	109.1	101.2	87.9	116.3	110.0	94.4
12	119.1	115.3	101.0	123.1	116.0	97.4	104.2	102.0	86.8
13	113.3	117.5	97.7	95.1	100.7	91.1	95.4	99.9	90.1
14	114.0	115.4	96.9	103.7	106.9	97.9	105.7	101.2	92.8
15	104.6	108.6	94.4	75.9	78.8	78.3	85.3	80.3	79.1
16	115.9	113.9	94.7	96.2	103.0	92.6	97.0	98.0	89.2
17	114.7	119.9	106.7	95.0	103.3	94.7	86.9	94.6	85.2
18	118.7	110.8	96.0	111.3	108.0	100.0	116.1	101.1	97.2
19	113.8	111.9	93.0	37.3	65.9	69.8	113.5	109.6	96.5
20	111.8	117.4	97.0	100.1	102.2	94.6	88.9	88.0	82.7
21	115.4	113.4	92.0	105.5	107.2	96.9	109.4	101.7	95.1
22	101.0	106.6	88.6	76.3	78.3	82.7	78.5	78.9	79.5

* The Nos. are corresponding to Table 1.

2.5 实际样品测定

采用本文优化的检测方法,对实验室日常检测的纺织品和皮革中的禁用芳香胺进行测定,发现部分样品中可检出芳香胺的某些组分(见表 4);表 4

中还列出了本实验室采用 GC-MS^[3]测定的结果。计算两种方法所得结果的 E_n 值^[19],均小于 1,表明两种测定方法的结果基本一致。

表 4 实际阳性样品的测定结果

Table 4 Analytical results of real positive samples

Sample No. and type	This method/(mg/kg)	GC-MS method/(mg/kg)
8044-2 cloth/olive	benzidine: 29.2	benzidine: 28.1
14605-1 canvas/dark blue	3,3'-dimethoxybenzidine: 10.5	3,3'-dimethoxybenzidine: 10.2
14446-2 leather/navy	benzidine: 23.8	benzidine: 25.0

3 结论

UHPLC-MS/MS 具有分析速度快、灵敏度好、能有效去除基体杂质干扰和假阳性现象等优点。本文利用 UHPLC-MS/MS 对纺织品和皮革中偶氮染料释放的 22 种致癌芳香胺进行了测定,所建立的方法完全满足欧盟与我国国家标准对禁用致癌芳香胺的测定要求,可作为常规方法进行日常批量分析检测,也可对 GC-MS 法检测的阳性样品进行确证,并且可作为日常检测中的快速筛选方法。

参考文献:

- [1] Robinson T, McMullan G, Marchant R, et al. Bioresour Technol, 2001, 77(3): 247
- [2] Skipper P L, Kim M Y, Sun H L P, et al. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 50
- [3] BS EN 14362-1: 2012
- [4] ISO 17234-1: 2010
- [5] ISO 17234-2: 2011
- [6] GB/T 17592-2011
- [7] Kataoka H. J Chromatogr A, 1996, 733(1): 19
- [8] Hong X Y, Wen Y Y, Lin F, et al. Journal of Instrumental Analysis (洪小燕,温裕云,林芳,等.分析测试学报), 2010, 29(1): 31

- [9] Kang S Y, Zhang Q, Bai H, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (康苏媛, 张庆, 白桦, 等. 分析化学), 2011, 39(6): 872
- [10] Wang H H, Niu Z Y, Ye X W, et al. Journal of Instrumental Analysis (王卉卉, 牛增元, 叶曦雯, 等. 分析测试学报), 2009, 28(8): 944
- [11] Ding J H, He H X, Lin H L, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (丁健桦, 何海霞, 林海禄, 等. 分析化学), 2008, 36(12): 1662
- [12] Zhu Y, Zhu Y, Wang L L. Chinese Journal of Chromatography (诸寅, 朱岩, 王丽丽. 色谱), 2012, 30(4): 345
- [13] Sun Y F, Niu Z Y, Ye X W, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (孙银峰, 牛增元, 叶曦雯, 等. 分析化学), 2009, 37(6): 861
- [14] Sutthivaiyakit P, Achatz S, Lintelmann J, et al. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(1): 268
- [15] Zhang Y, Yang C D, Yang L, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis (张焱, 杨成对, 杨理, 等. 理化检验: 化学分册), 2011, 47(2): 183
- [16] Han J, Yang S P, Zhang X, et al. Rock and Mineral Analysis (韩京, 杨水平, 张燮, 等. 岩矿测试), 2009, 28(6): 507
- [17] Wu Z Z, Ding J H, Lai J H, et al. Rock and Mineral Analysis (吴转璋, 丁健桦, 赖劲虎, 等. 岩矿测试), 2008, 27(4): 250
- [18] Tang C J, Nie J M, Wang X N, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (唐川江, 聂锦梅, 王晓宁, 等. 分析试验室), 2011, 30(9): 75
- [19] Yu H X. Advanced Measurement and Laboratory Management (虞惠霞. 现代测量与实验室管理), 2006(5): 42